

Rec'd PCT/PTO 18 JAN 2005

#2
PCT/JP03/09086

10/521596

17.07.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-209805
[ST. 10/C]: [JP2002-209805]

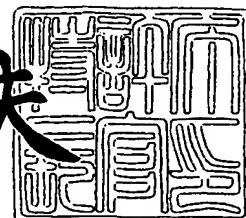
出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人農業技術研究機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3068312

【書類名】 特許願

【整理番号】 ARO-A0202

【提出日】 平成14年 7月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 三重県津市一身田大古曾 670 一身田宿舎A 403

【氏名】 川頭 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 三重県津市南新町 13-1 古川住宅 1-302

【氏名】 杉山 慶太

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市長江東町 2-6-31

【氏名】 守川 俊幸

【発明者】

【住所又は居所】 香川県善通寺市善通寺町 7-12-14

【氏名】 笹谷 孝英

【特許出願人】

【識別番号】 501203344

【氏名又は名称】 独立行政法人農業技術研究機構

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸。

(a) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。

(b) 配列番号: 1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 2】 RNAである、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】 DNAである、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 4】 請求項 2 に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンスRNAをコードするDNA。

【請求項 5】 請求項 2 に記載の核酸と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA。

【請求項 6】 請求項 2 に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA。

【請求項 7】 請求項 3 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 8】 請求項 3 に記載の核酸または請求項 7 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

【請求項 9】 請求項 1 に記載の核酸によりコードされるタンパク質。

【請求項 10】 請求項 9 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 11】 請求項 8 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 9 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 12】 請求項 4 から 6 のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

【請求項 13】 請求項 1 に記載の核酸、請求項 4 から 6 のいずれかに記載のDNA、または請求項 7 もしくは 12 に記載のベクターを保持する形質転換植物

細胞。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 15】 請求項 14 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

【請求項 16】 請求項 14 または 15 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項 17】 ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法であって、植物細胞またはミラフィオリレタスウイルスの媒介菌である *Olpidium brassicae* における、請求項 1 に記載の核酸または請求項 9 に記載のタンパク質を検出することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸および該核酸によりコードされるタンパク質、並びにそれらの製造および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

ミラフィオリレタスウイルス (MiLV) は、2000年イタリアでビッグベイン症状を示したレタスより分離され(P. Roggero et al., (2000) Archives of Virology 145: 2629-2642)、2002年にはレタスビッグベイン病の病原ウイルスはレタスビッグベインウイルス (LBVV) ではなく、本ウイルスではないかという報告がされた(H. Lot et al., (2002) Phytopathology 92: 288-293)。本ウイルスは *Olpidium brassicae* (糸状菌) によって伝搬する土壌伝搬性ウイルスで、アメリカ、日本、ヨーロッパでレタスビッグベイン病を発生させ問題となっている。本ウイルスは *Ophiovirus* に属し、3分節ゲノムのマイナス鎖RNAからなり、それぞれの大きさは8.5、1.9および1.7kb で48kDaの外被タンパクを構造タンパクとして持っていることが報告されている。本ウイルスは最近発見されたためにその遺伝子情報などは明らかとされておらず、的確な遺伝子学的な診断法の確立が行われて

いない。

【0003】

本ウイルス病に対する抵抗性品種は数品種あるがその抵抗性は低く、また、有用な抵抗性素材も見つかっていない。そこで、本ウイルスに対する強度抵抗性の植物を作出するには、ウイルス遺伝子を植物に導入する方法が有用である。そのためにはウイルスの遺伝子配列を決定する必要がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸を単離し、その構造を解明することを目的とする。また、本発明は、植物における該核酸またはそのアンチセンスの発現を通じて、植物にミラフィオリレタスウイルスに対する抵抗性を付与することを目的とする。さらに、本発明は、該核酸あるいは該核酸によりコードされるタンパク質を検出することによるミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法を提供することも目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

ミラフィオリレタスウイルスはRNAウイルスであり、該ウイルスのタンパク質をコードするDNAまたはそのアンチセンスDNAを植物体内で発現させれば、転写レベルあるいは翻訳レベルでミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生や機能を阻害することができると考えられる (P. F. Tennant, (1994), *Phytopathology* 84, 1359-1366、C. C. Huntley & T. C. Hall, (1993), *Virology* 192, 290-297)、D. C. Baulcombe, (1996), *The Plant Cell*, 8, 1833-1844)。

【0006】

本発明者等は、このような発想に着目してミラフィオリレタスウイルスに対する抵抗性植物を作製するため、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする遺伝子の単離を行なった。

【0007】

具体的には、本発明者らは、まず、ミラフィオリレタスウイルスを高度に純化

し、これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、該ウイルスを構成する外被タンパク質を検出した。この検出された外被タンパク質を精製し、ペプチドに分解後エドマン法によりその部分のアミノ酸配列を決定した。さらに、決定したアミノ酸配列の情報を基に設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードするDNAをクローニングし、その一次構造を決定した。

【0008】

次いで、ミラフィオリレタスウイルスの全外被タンパク質をコードする遺伝子を決定するために、純化ウイルスからRNAを調製し、このRNA分子を用いて5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)を実施した。その結果、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードする複数のDNA分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。

【0009】

単離したDNA分子またはそのアンチセンス分子は、その発現により植物体にミラフィオリレタスウイルス抵抗性を付与することが可能であり、これにより植物の生産性の向上を図ることができる。また、単離したDNA分子の配列情報を基にミラフィオリレタスウイルス特異的プライマーを設計し、これを利用することによりミラフィオリレタスウイルスの遺伝診断を行うことも可能である。また、得られた配列情報を基に、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質に結合する抗血清を作製して、これをミラフィオリレタスウイルスの血清学的診断法に利用することも可能である。

【0010】

本発明は、以上のような知見を基に完成されたものであり、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸、並びにそれらの製造および用途を提供する。より詳しくは、本発明は、

(1) ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸、

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、(1) に記載の核酸。

- (2) RNAである、(1) に記載の核酸、
- (3) DNAである、(1) に記載の核酸、
- (4) (2) に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンスRNAをコードするDNA、
- (5) (2) に記載の核酸と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA、
- (6) (2) に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、
- (7) (3) に記載の核酸を含むベクター、
- (8) (3) に記載の核酸または(7) に記載のベクターを保持する形質転換細胞、
- (9) (1) に記載の核酸によりコードされるタンパク質、
- (10) (9) に記載のタンパク質に結合する抗体、
- (11) (8) に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(9) に記載のタンパク質の製造方法、
- (12) (4) から(6) のいずれかに記載のDNAを含むベクター、
- (13) (1) に記載の核酸、(4) から(6) のいずれかに記載のDNA、または(7) もしくは(12) に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞、
- (14) (13) に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、
- (15) (14) に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、
- (16) (14) または(15) に記載の形質転換植物体の繁殖材料、および
- (17) ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法であって、植物細胞またはミラフィオリレタスウイルスの媒介菌である *Olpidium brassicae* における、(1) に記載の核酸または(9) に記載のタンパク質を検出することを

特徴とする方法、を提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明は、ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質および該タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより単離されたミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示した。単離したcDNAは1514bpの塩基配列からなり、437アミノ酸をコードしていた。これはミラフィオリレタスウイルスの遺伝子およびタンパク質の一次構造を示した初めての例である。

【0012】

本発明のタンパク質をコードする核酸には、DNAおよびRNAが含まれる。このDNAにはcDNAおよび化学合成DNAが含まれ、また、RNAにはウイルスゲノムRNA、mRNA、合成RNAが含まれる。本発明の核酸は、当業者にとって常套手段を利用して調製することが可能である。具体的には、純化ウイルスをSDS-フェノール法などの方法で除タンパク質して調製したRNA、あるいはCTAB法などでウイルス感染葉から抽出した全核酸を鋳型として、本発明の核酸の配列から設計したプライマーあるいはランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なうことで第一鎖DNAを合成できる。この方法で作製した第一鎖DNAから、Gubler & Hoffman法 (U. Gulber & B. J. Hoffman, (1983), Gene 25, 263) により第二鎖DNAを合成し、市販の数々のプラスミドあるいはファージミドベクターにクローニングできる。あるいは、第一鎖DNAを鋳型とし、本発明の核酸の配列から設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により本ウイルスのRNAをコードするDNAを増幅し、pGEM-Tベクターなどを用いたTAクローニング、あるいはプライマーに制限酵素サイトを付けることにより市販の数々のプラスミドベクターにクローニングできる。

【0013】

本発明の核酸は、組換えタンパク質の調製やミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物の作出に利用することもできる。

【0014】

組換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（M. Mandel, & A. Higa, (1970), Journal of Molecular Biology, 53, 158-162、D. Hanahan, (1983), Journal of Molecular Biology, 166, 557-580）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組換えタンパク質を上記したマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。

【0015】

得られた組換えタンパク質を用いれば、これに結合する抗体を調製することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。

。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

【0016】

ミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物を作出する場合には、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生や機能を抑制するDNAを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させればよい。

【0017】

ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生や機能を抑制するDNAとしては、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAのいずれかの鎖（センス鎖またはその相補鎖）にハイブリダイズするRNAをコードするDNAを用いることができる。

【0018】

ウイルスゲノムのセンス鎖およびmRNAにハイブリダイズするRNAをコードするDNAとしては、本発明者らにより単離された配列番号：2に記載のタンパク質をコードするDNA、好ましくは配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNAの転写産物に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAが挙げられる。ここで「相補的」とは、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含まれる。転写されたRNAは、標的とするミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAに対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。ここで「相補性」とは、2つの配列の対応する領域を、相補的塩基対の数が最大となるように整列させた場合における、該領域における全塩基数に対する相補的塩基対を形成した塩基数の%である。

【0019】

ウイルスゲノムRNAの相補鎖にハイブリダイズするRNAをコードするDNAとしては、本発明者らにより単離された配列番号：2に記載のタンパク質をコードするRNA、好ましくは配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むRNAの相補鎖に相補的なセンスRNAをコードするDNAを用いることができる。ここで「相補的」

とは、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含まれる。転写されたセンスRNAは、標的とするミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNA（相補鎖）に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。

【0020】

効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、上記アンチセンスRNAやセンスRNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上であり、通常、5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

【0021】

また、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を抑制するDNAとしては、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAの少なくとも一方の鎖を切断するリボザイムをコードするDNAを用いることも可能であると考えられる。

【0022】

リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990), 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

【0023】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M. Koizumi et al., (1988), FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能で

ある(M.Koizumi et al., (1988), FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990), 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M. Koizumi et al., (1989), Nucleic Acids Res. 17:7059)。例えば、本発明の遺伝子(配列番号:1)中には標的となりうる部位が複数存在する。

【0024】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan, Nature, 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi & N.Sasaki, (1992), Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

【0025】

標的を切断できるよう設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるようになりフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K.Taira et al., (1990), Protein Eng. 3:733、A.M.Dzianott & J.J.Bujarski, (1989), Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:4823、C.A.Grosshans & R.T.Cech, (1991), Nucleic Acids Res. 19:3875、K.Taira et al., (1991), Nucleic Acids Res. 19:5125)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyama et al., (1992), Biochem.Biophys.Res.Comm. 186:1271)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

【0026】

植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入されたDN

Aを発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。好適なベクターとしては、例えば、pBIバイナリーベクターが挙げられる。ベクターの導入される「植物細胞」には特に制限はないが、本発明の目的から、ミラフィオリレタスウイルスが感染性を有する植物が好適である。ミラフィオリレタスウイルスが感染性を有する植物としては、レタス以外に、例えば、Chenopodium quinoa(アカザ科)、Nicotiana benthamiana(ナス科)(P. Roggero et al., (2000) Archives of Virology 145: 2629-2642)が挙げられる。「植物細胞」の形態は、植物体への再生が可能である限り、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

【0027】

植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、ポリカチオン法、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。例えば、文献（S. Z. Pang et al., (1996), The Plant Journal 9: 899-909)に記載の方法は好適な方法の一例である。

【0028】

形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。好適な再生の方法としては、例えば、文献（S. Enomoto, et al., (1990), Plant Cell Reports 9:6-9）に記載の方法が挙げられる。

【0029】

一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫お

よびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

【0030】

また、本発明は、ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法を提供する。本発明の診断方法の一つの態様は、プライマーあるいはプローブを利用したミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAを検出することを特徴とする方法である。このようなプローブやプライマーとしては、配列番号：2に記載のミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするDNAに相同的または相補的な少なくとも15ヌクレオチドからなる核酸を用いることができる。該核酸は、好ましくは配列番号：2に記載のミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするDNAに特異的にハイブリダイズする核酸である。

【0031】

プライマーやプローブは必要に応じて標識されていてもよい。標識としては、例えば、放射標識が挙げられる。

【0032】

この診断においては、例えば、ミラフィオリレタスウイルスに感染したことが疑われる植物、本ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidium brassicae*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法あるいは上記のプローブを利用したノーザンブロッティング法を実施すればよい。

【0033】

本発明の診断方法の他の一つの態様は、抗体を利用したミラフィオリレタスウイルスタンパク質を検出することを特徴とする方法である。この診断に用いる抗体の調製は、例えば、得られたアミノ酸配列（配列番号：2）から抗原領域を推定してペプチドを合成し、KLHあるいはBSAなどのキャリアタンパクに結合させ、これをウサギに免疫することにより調製することができる。また、QIAexpress Type IVKit（QIAGEN社）を用いて、大腸菌で発現させたミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をヒスチジンでタグgingし、得られたタンパク質をウサギに免疫することにより調製することもできる。抗体は、必要に応じて標識されて

いてもよい。標識としては、例えば、酵素標識が挙げられる。また、抗体自体を直接標識しなくとも、抗体に結合する物質、例えば、プロテインAなどを介して標識して、目的のタンパク質を検出してもよい。

【0034】

この診断においては、例えば、ミラフィオリレタスウイルスに感染したことが疑われる植物、本ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidium brassicae*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記の抗体を用いてELISA法あるいはウエスタンブロット法を実施すればよい。

【0035】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0036】

【実施例1】 ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質遺伝子のクローニング

1999年に兵庫県のレタス圃場より採集した汚染土にレタスを播種し、発病株を *Chenopodium quinoa* に汁液接種し、増殖したウイルスを *C. quinoa* でさらに増殖させてウイルス純化材料とした。ウイルス純化は、Morikawaら (T. Morikawa et al., (1995), Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61:578-581) のチューリップ微斑モザイクウイルスの精製法を改変して行った。まず、ミラフィオリレタスウイルス感染葉に、5mM Na-DIECA、0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール、1mM Na-EDTAを含むTris-HCl (pH8.0)を加えてホモジナイズした。また、四塩化炭素処理を省き、最後のCsCl密度勾配遠心の代わりにCs₂SO₄の密度勾配遠心し、ウイルス画分を得た。本純化法で得られた純化ウイルスをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、48kDaの一本のバンドのみが検出された。また、電子顕微鏡観察ではMILVの粒子のみが観察され他の不純物が観察されなかったことより、高純度の純化ウイルスが得られていることが分かった。

【0037】

ウイルス核酸の抽出は、純化ウイルスをフェノール/クロロホルム処理後、エ

タノール沈殿で行った。1stcDNAの作製にはp(dN)₆プライマーを用い、First-str and cDNA Synthesis Kit (amersham pharmacia biotech)によって作製した。

【0038】

ペプチドマップ作成によるMiLV外被タンパク質の内部アミノ酸配列の決定は以下のようにして行った。純化MiLVを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマジー染色し、48kDaの目的のバンドを切り出し、カルボキシメチル化後、リジルエンドペプチターゼ処理した。処理後、逆相HPLCによるペプチドマッピングにより81本のパターンを得た。それらのパターンのうち数パターンについてアミノ酸の配列を決定した。

【0039】

得られた数種のアミノ酸配列のうち、EGETAI (配列番号: 3) および LPTEVS (配列番号: 4) を基にdYK5プライマー (GARGGIGARACIGCIAT/配列番号: 5) およびdYK8プライマー (SWIACYTCIGTIGGIAR/配列番号: 6) を設計し、Taq DNA Polymerase (Promega) を用いてPCRを行ったところ、約750bpのPCR産物が得られた。得られたPCR産物をpGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングし、外被タンパク質をコードする塩基配列の一部を決定した。

【0040】

MiLVは純化ウイルス中にプラス鎖とマイナス鎖両方を含むため、5' RACEのみで外被タンパク質遺伝子の全配列を決定することができる。RACE用の1stcDNAの作製にはp(dN)₆プライマーを用い、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) によって作製した。次いで、外被タンパク質をコードする塩基配列に特異的なプライマーを用いてRACEを行い、約750bpおよび約700bpのPCR産物を得た。得られたPCR産物はpGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

【0041】

以上の方法により、配列番号: 1 に示した1514bpの塩基配列を決定した。本遺伝子は86塩基より翻訳がスタートし、配列番号: 2 に示した437残基のアミノ酸をコードしていた。

【0042】

【発明の効果】

本研究ではMiLV抵抗性の形質転換植物を作出するために、MiLVの外被タンパク質の遺伝子およびその近傍の遺伝子を決定した。本遺伝情報はMiLV外被タンパク質およびその近傍の遺伝子、あるいはそれらのアンチセンスの遺伝子を導入することによりMiLV抵抗性形質転換植物の開発が可能となる。本遺伝情報を基にしてMiLV特異的プライマーの設計によりMiLVの遺伝診断法にも利用できる。また、得られたMiLV外被タンパク質のアミノ酸配列を基にした合成ペプチドに対する抗血清、あるいは大腸菌で発現させたMiLVの外被タンパクに対する抗血清を作製し、血清学的診断法にも利用できる。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Organization

<120> Nucleic acids encoding mirafiori lettuce virus proteins and utilization thereof.

<130> ARO-A0202

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1514

<212> DNA

<213> mirafiori lettuce virus

<220>

<221> CDS

<222> (87)..(1400)

<400> 1

gattatTTTT taaaaatata acaagctcat aagaaaacaa cttctccact caaaagtga 60

tcTTTTcaaa gaaaaacaaa gtcaca atg tca gga gta tac aag gtt tcc gga 113

Met Ser Gly Val Tyr Lys Val Ser Gly

1

5

att cag tct atc ttg caa aaa gat gtg act tcc gaa gga gaa aca gct 161

Ile Gln Ser Ile Leu Gln Lys Asp Val Thr Ser Glu Gly Glu Thr Ala

10

15

20

25

att cta att tct ctt ggt ctc atg aca aaa gaa gag aag cct gtt cct 209

Ile Leu Ile Ser Leu Gly Leu Met Thr Lys Glu Glu Lys Pro Val Pro

30

35

40

gca aaa atg gcc atg gtg gca tct gca aaa gca aac tca atc atc ttt 257

Ala Lys Met Ala Met Val Ala Ser Ala Lys Ala Asn Ser Ile Ile Phe

45

50

55

gtt tcg gaa gat ggc tct ttg tct ttt gaa gct cca aaa gaa aca gga 305

Val Ser Glu Asp Gly Ser Leu Ser Phe Glu Ala Pro Lys Glu Thr Gly

60

65

70

gag acc agc aaa cca gga gag aag aaa gag gaa aag aag gta gaa gtg 353

Glu Thr Ser Lys Pro Gly Glu Lys Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Val

75

80

85

gga gtc aag ttt cct ttc agc gca gcc aaa gta aag gag cta att gaa 401

Gly Val Lys Phe Pro Phe Ser Ala Ala Lys Val Lys Glu Leu Ile Glu

90

95

100

105

ggg aaa agt ctt act ttg gat cag gac aaa atc caa aaa gtg ctg gaa 449

Gly Lys Ser Leu Thr Leu Asp Gln Asp Lys Ile Gln Lys Val Leu Glu

110

115

120

gaa tat gtt aag aat ttg cca agg act gct gag act tac aaa cca aaa 497

Glu Tyr Val Lys Asn Leu Pro Arg Thr Ala Glu Thr Tyr Lys Pro Lys

125

130

135

gag att gag atc aaa tgt ttc aag ggt gtt gac ttc agt ata agc agt 545

Glu Ile Glu Ile Lys Cys Phe Lys Gly Val Asp Phe Ser Ile Ser Ser

140

145

150

ttg ctt tct tca ggg acc aaa atc tta gat gct att ctt tac agt act 593

Leu Leu Ser Ser Gly Thr Lys Ile Leu Asp Ala Ile Leu Tyr Ser Thr

155

160

165

tac aag gat tca gca gag cac aac ttc ata ttt gat gtg aaa gtt cta 641

Tyr Lys Asp Ser Ala Glu His Asn Phe Ile Phe Asp Val Lys Val Leu

170

175

180

185

tct cct gat ttc atc gat agc aag tta ctc gtg aac aac atc gaa aca 689
Ser Pro Asp Phe Ile Asp Ser Lys Leu Leu Val Asn Asn Ile Glu Thr
190 195 200

ggc aat cga gca atc aaa gca gct ttc tgt ctt gtt tac aat caa ggt 737
Gly Asn Arg Ala Ile Lys Ala Ala Phe Cys Leu Val Tyr Asn Gln Gly
205 210 215

gga ttg cca tca aag acg agt gaa gaa cga cca cta tct aag ttt gta 785
Gly Leu Pro Ser Lys Thr Ser Glu Glu Arg Pro Leu Ser Lys Phe Val
220 225 230

aga gaa acg ata ttc cgt gag aaa gat ctc aaa gct aac gag tta tgt 833
Arg Glu Thr Ile Phe Arg Glu Lys Asp Leu Lys Ala Asn Glu Leu Cys
235 240 245

gaa tat ctg tca tca gca gat cct tct ttg ttt cca agt caa gtc ttt 881
Glu Tyr Leu Ser Ser Ala Asp Pro Ser Leu Phe Pro Ser Gln Val Phe
250 255 260 265

ttg aaa atc tca ctt gaa aac ctt cct act gag gtt tca tca cgt tgc 929
Leu Lys Ile Ser Leu Glu Asn Leu Pro Thr Glu Val Ser Ser Arg Cys
270 275 280

aag atg tcg att gcg ggc aac aaa gca atg aga tat gca ctc tta gct 977
Lys Met Ser Ile Ala Gly Asn Lys Ala Met Arg Tyr Ala Leu Leu Ala
285 290 295

caa aag ttt gac aaa gat gaa att cca gtt cca aca gaa gtg aat cct 1025

Gln Lys Phe Asp Lys Asp Glu Ile Pro Val Pro Thr Glu Val Asn Pro
300 305 310

aca act agc tca gaa tac atg cag aaa aag gag aaa ata gaa aaa gca 1073
Thr Thr Ser Ser Glu Tyr Met Gln Lys Lys Glu Lys Ile Glu Lys Ala
315 320 325

aaa aag ata gtt gat gtt cta tgt tct ctt gct tct gac ttc cag gca 1121
Lys Lys Ile Val Asp Val Leu Cys Ser Leu Ala Ser Asp Phe Gln Ala
330 335 340 345

caa gtg aaa atg cat cct ctc tcc cct gag aga tca tcg agg aag aat 1169
Gln Val Lys Met His Pro Leu Ser Pro Glu Arg Ser Ser Arg Lys Asn
350 355 360

ttc act ctg caa ttg act tct gca att gtt act tca ctt tcc tac aaa 1217
Phe Thr Leu Gln Leu Thr Ser Ala Ile Val Thr Ser Leu Ser Tyr Lys
365 370 375

ggg agg tta gac atg aga aaa gca atc gaa gag aaa aag ata gag gct 1265
Gly Arg Leu Asp Met Arg Lys Ala Ile Glu Glu Lys Lys Ile Glu Ala
380 385 390

ttc aaa aga gat gaa aat ata ttt gga agg tta aat gct ctt gga caa 1313
Phe Lys Arg Asp Glu Asn Ile Phe Gly Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gln
395 400 405

ccc acg ttt cct gtt ctg act aac gca gat gct gac ttt tct gaa ttg 1361
Pro Thr Phe Pro Val Leu Thr Asn Ala Asp Ala Asp Phe Ser Glu Leu

410

415

420

425

tca gtt gag gcc gtg aag aca gct tac gga aag aaa tga gggcagaatc 1410

Ser Val Glu Ala Val Lys Thr Ala Tyr Gly Lys Lys

430

435

ggagtgaata gtgaagaatg tggaattgtg gacagatttg cttttttccg cttatccttt 1470

gcgataggga gtatgtgaac tgatagtttt aataaaaaaac tatc 1514

<210> 2

<211> 437

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 2

Met Ser Gly Val Tyr Lys Val Ser Gly Ile Gln Ser Ile Leu Gln Lys

1

5

10

15

Asp Val Thr Ser Glu Gly Glu Thr Ala Ile Leu Ile Ser Leu Gly Leu

20

25

30

Met Thr Lys Glu Glu Lys Pro Val Pro Ala Lys Met Ala Met Val Ala

35

40

45

Ser Ala Lys Ala Asn Ser Ile Ile Phe Val Ser Glu Asp Gly Ser Leu

50

55

60

Ser Phe Glu Ala Pro Lys Glu Thr Gly Glu Thr Ser Lys Pro Gly Glu

65

70

75

80

Lys Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Val Gly Val Lys Phe Pro Phe Ser

85

90

95

Ala Ala Lys Val Lys Glu Leu Ile Glu Gly Lys Ser Leu Thr Leu Asp
100 105 110
Gln Asp Lys Ile Gln Lys Val Leu Glu Glu Tyr Val Lys Asn Leu Pro
115 120 125
Arg Thr Ala Glu Thr Tyr Lys Pro Lys Glu Ile Glu Ile Lys Cys Phe
130 135 140
Lys Gly Val Asp Phe Ser Ile Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Thr Lys
145 150 155 160
Ile Leu Asp Ala Ile Leu Tyr Ser Thr Tyr Lys Asp Ser Ala Glu His
165 170 175
Asn Phe Ile Phe Asp Val Lys Val Leu Ser Pro Asp Phe Ile Asp Ser
180 185 190
Lys Leu Leu Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Asn Arg Ala Ile Lys Ala
195 200 205
Ala Phe Cys Leu Val Tyr Asn Gln Gly Gly Leu Pro Ser Lys Thr Ser
210 215 220
Glu Glu Arg Pro Leu Ser Lys Phe Val Arg Glu Thr Ile Phe Arg Glu
225 230 235 240
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Glu Leu Cys Glu Tyr Leu Ser Ser Ala Asp
245 250 255
Pro Ser Leu Phe Pro Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Ser Leu Glu Asn
260 265 270
Leu Pro Thr Glu Val Ser Ser Arg Cys Lys Met Ser Ile Ala Gly Asn
275 280 285
Lys Ala Met Arg Tyr Ala Leu Leu Ala Gln Lys Phe Asp Lys Asp Glu
290 295 300
Ile Pro Val Pro Thr Glu Val Asn Pro Thr Thr Ser Ser Glu Tyr Met
305 310 315 320
Gln Lys Lys Glu Lys Ile Glu Lys Ala Lys Lys Ile Val Asp Val Leu

325 330 335
Cys Ser Leu Ala Ser Asp Phe Gln Ala Gln Val Lys Met His Pro Leu
340 345 350
Ser Pro Glu Arg Ser Ser Arg Lys Asn Phe Thr Leu Gln Leu Thr Ser
355 360 365
Ala Ile Val Thr Ser Leu Ser Tyr Lys Gly Arg Leu Asp Met Arg Lys
370 375 380
Ala Ile Glu Glu Lys Lys Ile Glu Ala Phe Lys Arg Asp Glu Asn Ile
385 390 395 400
Phe Gly Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gln Pro Thr Phe Pro Val Leu Thr
405 410 415
Asn Ala Asp Ala Asp Phe Ser Glu Leu Ser Val Glu Ala Val Lys Thr
420 425 430
Ala Tyr Gly Lys Lys
435

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 3

Glu Gly Glu Thr Ala Ile

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 4

Leu Pro Thr Glu Val Ser

1

5

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<400> 5

garggngara cngcnat

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<400> 6

swnacytcng tnggnar

17

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ミラフィオリレタスウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸を単離し、これを利用して植物にミラフィオリレタスウイルスに対する抵抗性を付与する。さらに、該核酸あるいは該核酸によりコードされるタンパク質を検出することによるミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法を提供する。

【解決手段】 高度に純化したミラフィオリレタスウイルスからその外被タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列の情報を基に設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードするDNAをクローニングし、その一次構造を解明した。得られた配列情報を基に設計したプライマーを用いた5'RACEを実施することにより、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードする複数のDNA分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。これを利用してミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物の作出およびミラフィオリレタスウイルスの感染の診断を行なうことが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

特願 2002-209805

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501203344]

1. 変更年月日
[変更理由]

2001年 5月22日

新規登録

住 所
氏 名

茨城県つくば市観音台3-1-1
独立行政法人 農業技術研究機構